Zeitschrift: Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Entomologique Suisse = Journal of the Swiss Entomological Society

Herausgeber: Schweizerische Entomologische Gesellschaft

Band: 40 (1967-1968)

Heft: 3-4

Artikel: Über die Kalkkörperchen im Mitteldarmepithel der Honigbiene (Apis mellifica L.) und ihr Auftreten im Verlaufe der postembryonalen Entwicklung

Autor: Fyg, W.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-401541

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 15.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

MITTEILUNGEN DER SCHWEIZERISCHEN ENTOMOLOGISCHEN GESELLSCHAFT
BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ ENTOMOLOGIQUE SUISSE
Band XL Heft 3 u. 4 15. April 1968

Über die Kalkkörperchen im Mitteldarmepithel der Honigbiene (Apis mellifica L.) und ihr Auftreten im Verlaufe der postembryonalen Entwicklung

von

W. FYG

638.12 :
591.33

Einleitung

In den Mitteldarmepithelzellen der adulten Honigbiene (Abb. 1, Epz) finden sich in grosser Zahl mikroskopisch kleine, farblose und stark lichtbrechende, kugelige Körperchen, welche einen Durchmesser von 0,4–2,5 μ besitzen. Sie treten bei jeder gesunden Bienenkönigin,

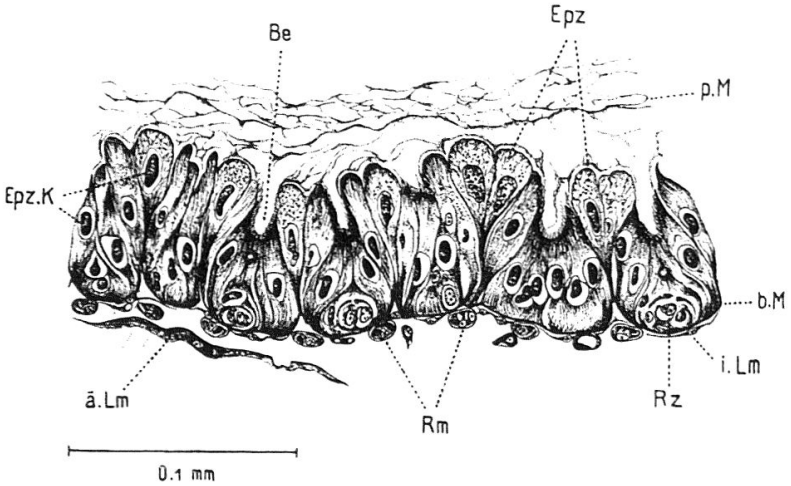


Abb. 1. — Längsschnitt durch die Mitteldarmwand einer eintägigen Arbeitsbiene.

Arbeitsbiene und Drohne als charakeristische Zellbestandteile auf und liegen in den Epithelzellen vorwiegend distal vom Zellkern (Abb. 2, Ca). Ihre Menge schwankt nicht nur von Biene zu Biene, sondern auch von einer Darmzelle zur andern. Am zahlreichsten und grössten sind sie in der Regel im vordern und mittleren Teil des Mitteldarmes ; in seinem Endabschnitt werden sie kleiner und spärlicher. Die Regenerationszellen (Abb. 1, Rz) enthalten keine solchen Gebilde. Bei der holo-

und merokrinen Sekretion des Mitteldarmepithels (WEIL, 1935 ; LOTMAR, 1945) gelangen die Körperchen in das Darmlumen und lösen sich hier allmählich auf. Diese eigenartigen zytoplasmatischen Einschlüsse sind von SCHIEMENZ (1883) als Fettkügelchen, von FRENZEL (1886), LOELE (1913) und TRAPPMANN (1923) als Sekrettröpfchen und von PETERSEN (1912) als Proteinkörner gedeutet worden. Nach den Untersuchungen von KOEHLER (1920, 1921) handelt es sich dabei jedoch um anorganische Gebilde, welche mit Ausnahme einer dünnen Hüllschicht aus kohlensaurem Kalk bestehen. Sie stellte nämlich fest, dass

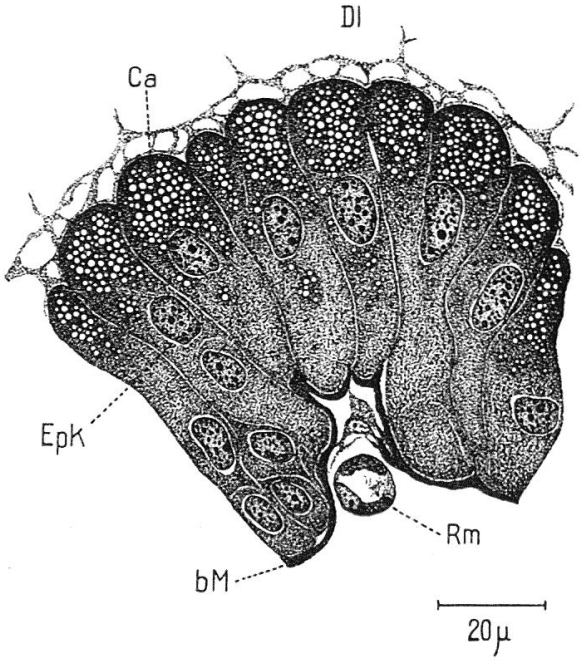


Abb. 2. — Kalkkörperchen in den Mitteldarmepithelzellen einer jungen Arbeitsbiene (Azokarmin-Färbung nach HEIDENHAIN-MALLORY).

die lichtbrechenden Einschlüsse in den Mitteldarmepithelzellen unverbrennbar sind und sich durch Zentrifugieren ohne jede Veränderung isolieren lassen. Ganz abgesehen von diesen zwei Befunden, die schon für sich allein gegen eine rein organische Zusammensetzung der Körperchen sprechen, hat KOEHLER folgendes ermittelt :

Die lichtbrechenden Zelleinschlüsse sind in fettlösenden Stoffen wie Alkohol, Äther und Chloroform unlöslich. Von Osmiumsäure werden sie nicht geschwärzt ; ebensowenig färben sie sich mit dem Fettfarbstoff Sudan III. Die Millon- und Xanthoproteinprobe ergeben am Darmgewebe eine deutlich positive, an den lichtbrechenden Körperchen jedoch keine Reaktion. Gegenüber einer mit Natronlauge versetzten Trypsinlösung verhalten sich die Zelleinschlüsse bei einer Temperatur von 37° C vollkommen indifferent und gehen nicht in Lösung. Ein negatives Resultat ergeben auch die Prüfungen auf Kohlehydrate, Glykogen und Chitin. Verdünnte und konzentrierte Natron- und Kalilauge sind wirkungslos. Von mineralischen und organischen Säuren werden die Körperchen dagegen noch in hoher Verdünnung sofort

und restlos aufgelöst. Beim Zusatz von Salzsäure findet nach vorgängiger Zerstörung des Darmgewebes mit Natronlauge eine lebhafte Gasbildung statt, welche für das Vorliegen von kohlensaurem Kalk spricht. Die Kalziumoxalatprobe fällt stets positiv aus ; im mikroskopischen Frischpräparat kann die Umwandlung der Zelleinschlüsse in typische Kalziumoxalatoktaeder unmittelbar verfolgt werden.

Nach diesen Untersuchungsergebnissen von KOEHLER ist kaum daran zu zweifeln, dass wir es bei den lichtbrechenden Kügelchen im Mitteldarmepithel der Honigbiene tatsächlich mit Kalkkörperchen zu tun haben. Ihre physiologische Bedeutung ist nicht bekannt. Um Reservestoffe kann es sich kaum handeln, denn KOEHLER hat bei hungernden Bienen keine Abnahme der Einschlüsse beobachtet. Möglicherweise sind es lediglich Ballaststoffe, die mit der Nahrung aufgenommen und als nicht verwertbar durch die Darmschleimhaut wieder ausgeschieden werden. Vielleicht sind sie für die Verdauung aber trotzdem wichtig. KOEHLER hält es nicht für ausgeschlossen, dass der kohlensaure Kalk zur Neutralisierung der beim Verdauungsprozess entstehenden Säuren dient und so den tryptischen Eiweissabbau ermöglicht.

Kurze Zeit nach dem Erscheinen der KOEHLER'SCHEN Publikation hat sich auch HERTIG (1923) sehr eingehend mit diesen Einschlüssen im Mitteldarmepithel der Honigbiene beschäftigt und die Frage nach ihrer Natur nochmals aufgeworfen. Es gelang ihm nämlich, mit der ROMANOWSKY- und GIEMSA-Färbung im Innern der Kalkkörperchen zuweilen ein sich intensiv purpurblau färbendes, häufig etwas exzentrisch liegendes Gebilde sichtbar zu machen, wenn die Bienendärme zuvor mit Osmiumsäuredämpfen fixiert wurden. Für die Beurteilung dieses interessanten Befundes ist es aber wesentlich, zu wissen, dass nicht alle lichtbrechenden Zelleinschlüsse einen solchen « Innenkörper » zeigen. HERTIG fand ihn nur in den intrazellulären Kalkkörperchen und auch hier nicht regelmässig. Die in das Darmlumen abgestossenen Einschlüsse liessen den « Innenkörper » stets vermissen. Diese Beobachtung veranlasste HERTIG immerhin, an der reinen Kalknatur der Körperchen zu zweifeln und die Vermutung zu äussern, dass es sich vielleicht um belebte, kalkbeschalte Gebilde handle. Er dachte dabei in erster Linie an einen noch unbekannten Krankheitserreger oder an Symbionten. Obwohl KOEHLER diese Möglichkeit ebenfalls erwogen, aber gestützt auf ihre Untersuchungsergebnisse verneint hat, liessen die Beobachtungen von HERTIG eine Nachprüfung doch als wünschenswert erscheinen. Aus diesem Grunde habe ich mich auf Anregung von Prof. Dr. O. Morgenthaler, dem damaligen Leiter der Bienenabteilung der Eidgenössischen milchwirtschaftlichen Versuchsanstalt Liebefeld bei Bern anfangs der Dreissigerjahre mit den Kalkkörperchen im Mitteldarmepithel der Honigbiene beschäftigt und einige Resultate in einer kurzen, vorläufigen Mitteilung (FYG, 1932) veröffentlicht. Die Befunde von KOEHLER konnten im wesentlichen bestätigt werden. Später vervollständigte ich meine histologischen und histochemischen Unter-

suchungen und dehnte sie auch auf die postembryonalen Entwicklungsstadien der Arbeitsbiene aus. Das letztere geschah in der Annahme, dass auf diese Weise vielleicht etwas Näheres über die Entstehung und physiologische Bedeutung der Kalkkörperchen zu erfahren sei. Diese Erwartung hat sich leider nicht erfüllt. Trotzdem dürfte eine Veröffentlichung der Untersuchungsergebnisse angezeigt sein, denn sie geben uns immerhin einige neue Aufschlüsse über den Kalkstoffwechsel der Honigbiene.

Material und Technisches

Das für die vorliegenden Untersuchungen benötigte Bienenmaterial konnte mit Ausnahme der Königinnen jeweilen vom Bienenstand der Eidgenössischen milchwirtschaftlichen Versuchsanstalt Liebefeld beschafft werden. Die erforderlichen Arbeitsbienen und Drohnen, sowie die verschiedenen Brutstadien wurden gesunden Völkern entnommen und im Laboratorium sogleich zweckdienlich verarbeitet. Die Bienenköniginnen stammten dagegen grösstenteils von fremden Ständen. Grundsätzlich benützte ich nur normal entwickelte, gesunde Königinnen, welche in lebensfrischem Zustand seziert und deren Därme deshalb sofort fixiert werden konnten.

Infolge der grossen Säureempfindlichkeit der Kalkkörperchen und der Unmöglichkeit, vom frischen Material ohne vorgängige Gelatine-Einbettung brauchbare Gefrierschnitte anzufertigen, musste für die Fixierung der Bienendärme und Brutstadien vorwiegend absoluter Äthylalkohol verwendet werden, in welchem Kalziumkarbonat praktisch unlöslich ist. Dem hochprozentigen Alkohol haftet allerdings der Nachteil an, dass er die feinen Zellstrukturen nur recht mangelhaft konserviert und die Gewebe ziemlich stark zum Schrumpfen bringt. Ein wesentlicher Vorteil ist aber der, dass die alkoholfixierten Objekte unmittelbar über Benzol oder Chloroform in Paraffin eingebettet und mit dem Mikrotom in beliebig dicke Schnitte zerlegt werden können. Dadurch wird jede schädigende Nachbehandlung vermieden, was gerade bei histochemischen Untersuchungen besonders wertvoll ist.

Von den übrigen, sonst üblichen Fixierungsmitteln erwies sich lediglich noch das rasch eindringende Gemisch von CARNOY als brauchbar. Bei nicht zu langer Einwirkung (höchstens 1 Stunde) konserviert es sowohl die Gewebe als auch die Kalkkörperchen sehr gut, obwohl es neben absolutem Äthylalkohol (60 Teile) und Chloroform (30 Teile) auch Eisessig (10 Teile) enthält.

Die 5–8 μ dicken Paraffinschnitte wurden nach der Methode von APÁTHY (ROMEIS, 1948) mit Eiweissglycerin und 30%igem Alkohol auf die mit Äther-Alkohol sorgfältig entfetteten Objektträger aufgeklebt. Für die Untersuchung des stofflichen Aufbaues der lichtbrechenden Zelleinschlüsse im Ventriculusepithel der adulten Arbeitsbienen, Königinnen und Drohnen verwendete ich nicht nur fixiertes Material,

sondern öfters auch frische, also unvorbehandelte Darmquetschpräparate. Irgendwelche Unterschiede im Ausfall der Kalziumreaktionen konnten nicht beobachtet werden. Diese Feststellung ist deshalb wertvoll, weil sich solche Quetschpräparate für gewisse Nachweisverfahren ebensogut oder noch fast besser eignen als Paraffinschnitte. Dies gilt vor allem für jene Methoden, bei denen die zur Anwendung gelangenden Reagentien das Darmgewebe mehr oder weniger zerstören oder die aufgeklebten Schnitte sehr leicht vom Objektträger ablösen.

In diesem Zusammenhang möchte ich noch auf eine kleine technische Massnahme hinweisen, welche sich bei der Untersuchung der Bienenbrut sehr gut bewährt hat. Da abgesehen von einigen spärlichen Angaben KOEHLER'S (1921) über das Auftreten der Kalkkörperchen während der Postembryogenese bislang nichts bekannt und der Ausfall der Kalkreaktionen im Darmtrakt der verschiedenen Brutstadien völlig ungewiss war, schien mir hier ein besonderer Test ebenso erwünscht wie nötig zu sein. Ich klebte deshalb auf jeden Objektträger unmittelbar neben die Larven- oder Puppenschnitte einen Darmlängsschnitt einer adulten Arbeitsbiene, welcher im Mitteldarmepithel reichlich Kalkkörperchen enthielt. Dieser als Kontrolle dienende Darmschnitt gab nicht nur Aufschluss über das Gelingen oder Misslingen der jeweils angewandten Kalknachweismethode, sondern ermöglichte auch eine zuverlässige Beurteilung der Reaktionsergebnisse in den larvalen und pupalen Gewebeschnitten.

Für den Kalziumnachweis im Darmtrakt der adulten Bienen und in den Brutstadien benützte ich die in der mir seinerzeit zur Verfügung stehenden Fachliteratur (ABDERHALDEN, 1912; SCHMORL, 1925; KRAUSE, 1927; LANGERON, 1934; LISON, 1936; ROMEIS, 1948; GOMORI, 1952) empfohlenen chemischen und histochemischen Verfahren, sowie verschiedene indikatorische Färbemethoden, wie sie in der histologischen Mikrotechnik für diesen Zweck üblich sind. Von spektralanalytischen Untersuchungen und vom Schnittveraschungsverfahren (SCHULTZ-BRAUNS, 1931) wurde dagegen in Ermangelung der nötigen Einrichtungen und Kenntnisse abgesehen. Es kann natürlich nicht die Aufgabe der vorliegenden Abhandlung sein, die Zuverlässigkeit der angewandten Methoden kritisch zu beurteilen; das muss den Fachchemikern überlassen bleiben. Immerhin sprechen die übereinstimmenden Ergebnisse, welche mit ihnen an einem grossen Bienenmaterial erzielt werden konnten und die ich im nachfolgenden mitteilen möchte, für ihre praktische Eignung.

Kalknachweis im Mitteldarmepithel der adulten Bienen

a) *Kalknachweis mit chemischen Methoden*

Mit den chemischen Methoden ist es möglich, Kalziumverbindungen in Geweben durch spezifische Reaktionen sicher nachzuweisen und

zwar auch dann, wenn sie nur in sehr geringen Mengen vorliegen. Leider werden bei ihrer Anwendung die Kalkkonkretionen aufgelöst und die Struktur der Körpergewebe mehr oder weniger zerstört. Sie geben uns somit wohl Aufschluss über das Vorhandensein von Kalzium im geprüften Gewebe, sagen aber meistens wenig oder gar nichts über seine Lokalisation aus. Zum einwandfreien Kalknachweis sind sie trotzdem unerlässlich.

In der histologischen Mikrotechnik gilt die Schwefelsäure als bestes und sehr empfindliches Kalkreagens (SCHMORL, 1925 ; KRAUSE, 1927 ; ROMEIS, 1948). Sie fällt den in den Geweben vorhandenen Kalk als Kalziumsulfat, wobei sich typische nadelbüschel- oder tafelförmige Gipskristalle bilden. Da das Kalziumsulfat in Wasser etwas löslich ist, bringt man das zu untersuchende Gewebe aus 40%igem Alkohol auf den Objektträger, setzt einen grössern Tropfen 3%ige Schwefelsäure zu und bedeckt das Präparat mit einem Deckglas. Schon nach kurzer Zeit erscheinen dann beim Vorliegen von Kalk an der Peripherie oder etwas über dem Objekt in grosser Zahl die charakteristischen Gipskristalle.

Ich habe diesen *Kalknachweis mit Schwefelsäure* an vielen Quetsch- und Schnittpräparaten von Arbeiterinnen-, Königinnen- und Drohnen-Mitteldärmen ausgeführt und zwar stets mit positivem Erfolg (Abb. 3). Winkelmessungen an den tafelförmigen Gipskristallen ergaben den für den stumpfen Winkel der Kalziumsulfatkristalle bezeichnenden Mittel-

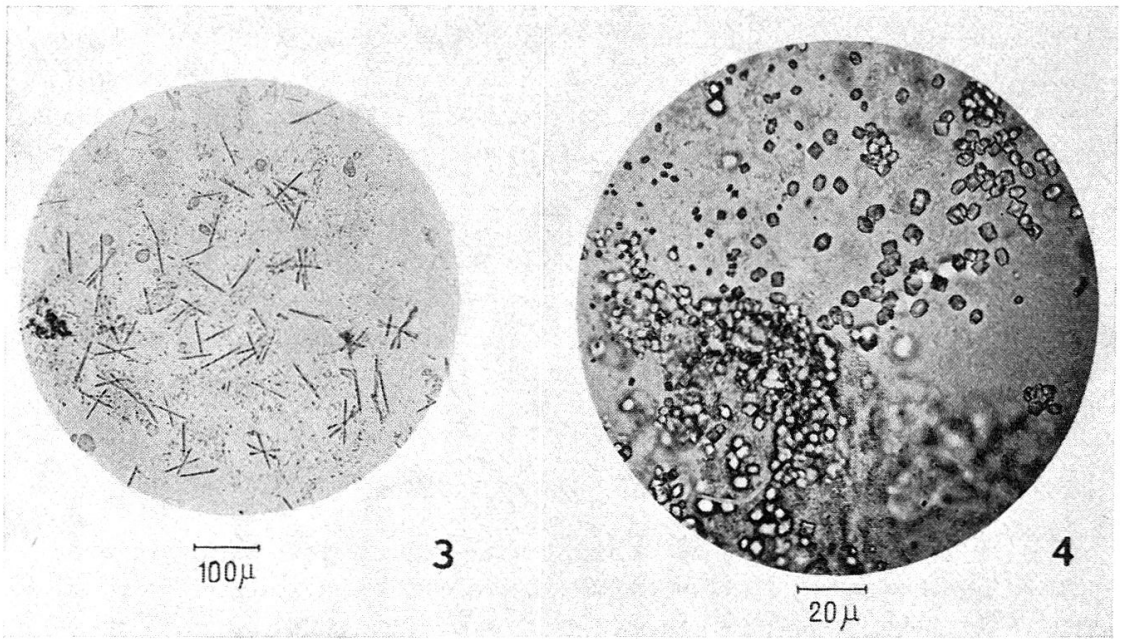


Abb. 3. — Kalknachweis mit Schwefelsäure (Gipsreaktion).

Abb. 4. — Kalknachweis mit Oxalsäure (Kalziumoxalatreaktion).

wert von 127°. Von der Überlegung ausgehend, dass möglicherweise ein Teil des nachgewiesenen Kalkes aus dem im Ventriculus befindlichen Nahrungsbrei stammen könnte, wurden die im Frischpräparat geprüften Därme vor der Reaktion sicherheitshalber längs aufgeschnitten und durch mehrmaliges Auswaschen in destilliertem Wasser vom Inhalt gänzlich befreit. Diese Massnahme hatte aber keinen Einfluss auf das positive Prüfungsergebnis.

Ebenso einfach und sicher wie mit Schwefelsäure kann der Kalk in den Geweben mit Hilfe einer 5%igen Lösung von Ammoniumoxalat in 5–10%iger Essigsäure oder mit Oxalsäure nachgewiesen werden. In beiden Fällen entstehen beim Vorliegen von Kalziumkarbonat die leicht kenntlichen Oktaeder des Kalziumoxalates. In Übereinstimmung mit KOEHLER (1921) stellte ich fest, dass diese *Kalziumoxalat-Reaktion* im Mitteldarmepithel der adulten Bienen stets positiv ist (Abb. 4). Für diesen Kalknachweis kann man entweder Schnitt- oder frische Darmquetschpräparate verwenden. Gegenüber der Gipsreaktion bietet er zudem den grossen Vorteil, dass die Umwandlung der Kalkkörperchen in Kalziumoxalatkristalle unmittelbar unter dem Mikroskop verfolgt werden kann. Beim Zusatz von 10%iger oder gesättigter Oxalsäurelösung werden sowohl die freiliegenden als auch die im Mitteldarmepithel reichlich vorhandenen rundlichen Körperchen zunächst kantig und nach etwa 20–30 Minuten treten dann im Gewebebrei oder im Schnittpräparat die ersten typischen Kalziumoxalatoktaeder auf. Daneben findet man aber auch ziemlich viele Kristalle, die eher an ein ovales Sechseck erinnern; das nämliche hat KOEHLER ebenfalls beobachtet.

Etwas seltsam verhalten sich die Kalkkörperchen, wie bereits KOEHLER (1921) erwähnt, gegenüber *Salzsäure*. Sie lösen sich darin allerdings sofort auf, aber nicht, wie man bei Gebilden aus Kalziumkarbonat erwarten sollte, unter deutlichem Aufbrausen. Sie zeigen vielmehr ein Verhalten, wie es für Kalziumphosphat kennzeichnend ist. Die Gasbildung und das Aufbrausen treten aber sofort ein, wenn das Darmgewebe vor dem Zusetzen der Salzsäure mit Natron- oder Kalilauge zerstört wird. KOEHLER vermutet deshalb, dass die Kalkkörperchen wohl eine dünne, aber schützende Hülle aus irgendeinem organischen Material besitzen, welche durch die Behandlung mit Alkalien vorerst aufgelöst werden muss.

b) *Kalknachweis mit histochemischen Methoden*

Obwohl LISON (1936) die Spezifität und damit den Wert von gewissen histochemischen Methoden, welche in der Fachliteratur zum Kalknachweis in Geweben allgemein empfohlen werden, bezweifelt, weil auch andere Stoffe ganz ähnlich reagieren, bieten sie doch den grossen Vorteil, dass man mit ihnen die Kalkablagerungen im Schnittpräparat am primären Ort sichtbar machen kann. Gerade bei den Kalkkörper-

chen im Mitteldarmepithel der Honigbiene zeigt sich, dass sie in Verbindung mit den oben beschriebenen chemischen Nachweisverfahren doch recht wertvolle Dienste leisten. Das gilt vor allem für die *Methode von Kossa* (v. KOSSA, 1901 ; SCHMORL, 1925 ; KRAUSE, 1927 ; ROMEIS, 1948), welche auf der Reduktion einer Silbernitratlösung durch Kalziumsalze beruht und bei einfacher Technik nach meinen Erfahrungen auch an alkoholfixiertem Material sehr gute Resultate gibt.

Die entparaffinierten Schnitte werden nach der üblichen Behandlung mit Alkohol aus destilliertem Wasser für 30–60 Minuten in eine 5%ige Lösung von Argentum nitricum übertragen und gleichzeitig dem hellen Tages- oder direktem Sonnenlicht ausgesetzt. Binnen kurzer Zeit treten die Kalkablagerungen tiefschwarz gefärbt hervor. Um das nicht reduzierte Silbernitrat aus den Geweben zu entfernen und die Präparate haltbar zu machen, empfiehlt es sich, die mit destilliertem Wasser sorgfältig abgespülten Schnitte einige Minuten in einer 5%igen Natriumthiosulfatlösung zu fixieren. Ebenso zweckdienlich ist ein Goldfixierbad. Nach nochmaligem gründlichem Auswaschen in Aqua dest. ist dann eine Nachfärbung mit Eosin oder Kernechtrot ohne weiteres möglich, wodurch der Kontrast noch wesentlich erhöht wird. Die Belichtung der Präparate kann übrigens nach STÖLTZNER (1905) durch kurzes Einlegen der Schnitte in eine verdünnte Pyrogallussäurelösung ersetzt werden.

Die Methode von KOSSA eignet sich sowohl nach der Originalvorschrift als auch in der Modifikation von STÖLTZNER vorzüglich zur Darstellung des Kalkes im Mitteldarmepithel der adulten Bienen (Abb. 5 und 6). Die Reaktion erfolgt wirklich nur an den Kalkkörperchen, die sich dann im Schnittpräparat durch ihre intensiv schwarze Farbe vom Gewebe äusserst scharf abheben. Bei starker Vergrösserung gewinnt man allerdings den Eindruck, dass die Reduktion des Silbers vielfach nur an der Oberfläche oder in den peripheren Schichten der Körperchen stattfindet. Das trifft vor allem dann zu, wenn die Präparate nicht mit Pyrogallol behandelt, sondern nur belichtet werden.

Weniger befriedigende Resultate erzielte ich mit einer andern, ebenfalls von STÖLTZNER (1905) empfohlenen *Modifikation der Methode von Kossa*, welche im wesentlichen darin besteht, dass zum Reduzieren des Silbers an Stelle von Pyrogallussäure eine Schwefelammoniumlösung benützt wird. Die Kalkkörperchen im Mitteldarmepithel der Arbeitsbienen schwärzen sich auf diese Weise auch, aber sie scheinen vielfach zusammengeballt zu sein (Abb. 7) und treten deshalb einzeln weniger deutlich hervor. Zudem wird das Gewebe sichtlich geschädigt und färbt sich stellenweise fleckig gelbbraun.

Nach den Angaben von KRAUSE (1927) hielt ich anfänglich auch das *Verfahren von Macallum* (1912) zum Nachweis kleinster Kalkmengen für zweckdienlich, obwohl ihm LISON (1936) jeden histochemischen Wert abspricht (ROMEIS, 1948).

Es beruht darauf, dass das anorganische Kalzium im Gewebe zunächst durch eine 20 Minuten dauernde Behandlung mit 2%igem schwefelsaurem Alkohol in Kalziumsulfat übergeführt wird. Nach sorgfältigem Abspülen in absolutem Äthylalkohol überträgt man die Schnitte für 30 Minuten in eine Bleiazetatlösung ; hier reagiert das Kalziumsulfat mit dem Bleiazetat unter Bildung von wasserunlöslichem, farblosem Bleisulfat, welches dann, nach nochmaligem gründlichem Auswaschen der Schnitte mit einer Glycerin-Ammoniumsulfidlösung als grauschwarzes Bleisulfid gefällt wird und so auf indirektem Wege die Kalkablagerungen im Gewebe sichtbar macht.

Nach meinen Erfahrungen kann diese Methode von MACALLUM bei Darmschnitten der Honigbiene aus zwei Gründen nur mit gewissen Abänderungen benützt werden. Die Kalkkörperchen im Mitteldarmepithel sind nämlich auch in stark verdünnten Säuren so leicht löslich, dass eine Vorbehandlung mit schwefelsaurem Alkohol nicht tunlich ist. Ausserdem wird das Gewebe in der Glycerin-Ammoniumsulfidlösung dermassen mazeriert, dass sich die Schnitte häufig vom Objektträger ablösen. Ich habe diese Schwierigkeiten dadurch zu umgehen versucht, dass die entparaffinierten Schnitte über Alkohol und Wasser jeweils für 3 Stunden unmittelbar in eine 3%ige Bleiazetatlösung übertragen und sodann nach kurzem Abspülen in 70%igem Alkohol einige Minuten nur den Dämpfen der Glycerin-Ammoniumsulfidlösung ausgesetzt wurden. Auf diese Weise gelingt es, sehr klare und instruktive Präparate zu erhalten, in welchen analog der KOSSA-Methode lediglich die Kalkkörperchen in den blassgelblich gefärbten Mitteldarmepithelzellen deutlich geschwärzt sind.

c) *Kalknachweis mit indikatorischen Färbmethoden*

Bei den indikatorischen Färbemethoden zum Nachweis von Kalziumverbindungen in Geweben haben wir es vorwiegend mit empirischen Farbreaktionen zu tun. Die chemischen Vorgänge, welche sich dabei abspielen, sind meines Wissens noch wenig abgeklärt. Offenbar handelt es sich vielfach um Lackbildungen. Wenn diese tinktoriellen Methoden vom Standpunkt des Chemikers auch wenig oder gar nicht spezifisch sind, so ermöglichen sie uns doch, die Kalkablagerungen in und zwischen den Gewebezellen in ihrer natürlichen Form und Lage deutlich sichtbar zu machen. Jedenfalls bilden sie eine wertvolle Ergänzung der chemischen Nachweisverfahren.

Die älteste Methode dieser Art, welche nach HINTZSCHE (1943) bereits im 18. und 19. Jahrhundert bekannt war, dürfte wohl die *Kalkfärbung mit Alizarin* sein.

Dieser ursprünglich aus der Krappwurzel (Rubia tinctorum) gewonnene und später synthetisch hergestellte Farbstoff (Dioxyanthrachinon) kann in einer 33%igen Soda- oder gesättigten alkoholischen Lösung als Reagens zum Kalziumnachweis in Knochen und Geweben dienen.

Der Kalk bildet mit Alizarin einen rotvioletten Farblack. Immerhin ist zu beachten, dass auch mit andern Erdalkalien und gewissen Schwermetallen ähnliche Lacke entstehen können. Die Reaktion ist also keineswegs spezifisch und hat nur in Verbindung mit andern Nachweismethoden einen gewissen indikatorischen Wert.

Die Kalkkörperchen im Mitteldarmepithel der adulten Bienen färben sich in einer gesättigten alkoholischen Lösung von Alizarin im Schnittpräparat bei einer Färbdauer von 12 Stunden an der Peripherie rötlichviolett. Werden die Schnitte anschliessend in 70%igem Alkohol und destilliertem Wasser ausgewaschen und sodann für eine Minute in stark verdünnte Natronlauge übertragen, so entfärbt sich das Darmgewebe ganz und die Kalkkörperchen treten dann in einem intensiv lilablauen Farbton scharf hervor. Man kann solche Präparate über Alkohol und Xylol in Balsam einschliessen, aber die elektive Färbung der Kalkkörperchen ist nach meinen Erfahrungen nur beschränkt haltbar.

Ganz ähnlich wie das Alizarin kann nach GRANDIS und MAININI (1900) auch das verwandte *Purpurin* zur Färbung von Kalziumablagerungen in Geweben verwendet werden.

Nach der Vorschrift der beiden Autoren benützt man dazu eine gesättigte Lösung des Farbstoffes in 95%igen Äthylalkohol. Gefrier- oder Paraffinschnitte von alkoholfixiertem Material bleiben so lang in der Farblösung, bis sie stark rot gefärbt sind, was in der Regel nach 5–10 Minuten der Fall ist. Kalkhaltige Gewebeteile zeichnen sich schon jetzt durch eine intensivere Rotfärbung aus. Die Schnitte werden dann sogleich in eine 0,75%ige Kochsalzlösung übertragen. Hier findet eine doppelte Umsetzung zwischen den Kalziumsalzen und dem Natriumchlorid statt ; an den Kalkorten entsteht in geringer Menge Kalziumchlorid, welches mit dem Purpurin einen roten, unlöslichen Farblack bildet (MACALLUM, 1912). Beim Auswaschen der Schnitte mit Alkohol entfärbt sich das Gewebe weitgehend, so dass eine reine Kalkfärbung resultiert.

Obwohl diese Methode nicht besonders empfindlich ist (KRAUSE, 1927 ; ROMEIS, 1948), gestattet sie doch, die Kalkkörperchen in den Mitteldarmschnitten von Bienenköniginnen, Arbeiterinnen und Drohnen in einem leuchtenden Rot sehr distinkt zu färben (Abb. 8).

Eine schöne und haltbare Färbung der Kalkkörperchen im Mitteldarmepithel der adulten Bienen lässt sich auch mit *Gallein* erzielen, sofern man der von SCHAETZ (KRAUSE, 1927) empfohlenen 0,5%igen alkoholischen Farblösung tropfenweise konzentrierte Natronlauge zusetzt, bis sie sattrot wird. Die Kalkkörperchen tingieren sich darin in 10–15 Minuten intensiv rotviolett bei gleichzeitiger schwächerer Mitfärbung des Gewebes. Werden die Schnitte anschliessend in 70%igem Alkohol ausgewaschen und sodann für 10 Sekunden in wässerige Natronlauge eingetaucht, so entfärbt sich das Darmgewebe vollständig und die Kalkkörperchen treten in einem tiefblauvioletten Ton äusserst

scharf hervor. Auch hier beschränkt sich die Tinktion auf die peripheren Schichten der lichtbrechenden Zelleinschlüsse (Abb. 9). Eine Nachfärbung mit Eosin oder Kernechtrot ist ebenfalls möglich und steigert den Kontrast.

Als besonders geeignet zur Färbung der Kalkkörperchen erwies sich bei meinen Untersuchungen auch das WEIGERT'SCHE *Eisenhämatoxylin* und zwar vor allem dann, wenn die Bienendärme in CARNOY'S Gemisch fixiert wurden. Bei einer Färbedauer von 2–3 Stunden und gründlichem Auswaschen der Schnitte in fliessendem Brunnenwasser heben sich die vorwiegend an der Peripherie dunkelblauschwarz gefärbten Kalkkörperchen vom blassblau getönten Darmgewebe ausserordentlich deutlich ab (Abb. 10). Eine Differenzierung in salzsaurem Alkohol und eine Nachfärbung mit einem roten Kontrastfarbstoff sind möglich, aber meistens gar nicht nötig. Diese allerdings unspezifische, aber sehr prägnante Kalkfärbung, welche auf einer Lackbildung beruht, ist deshalb bemerkenswert, weil KOEHLER (1921) weder mit Alaun-, noch mit DELAFIELD'SCHEM Hämatoxylin die Kalkkörperchen färben konnte.

Mit zwei *Verfahren von Roehl* (ROEHL, 1905 ; KRAUSE, 1927), nämlich mit der Kupfersulfat-Hämatoxylinfärbung und der Ammoniummolybdän-Zinnchlorür-Methode, welche beide zum Nachweis von Kalziumphosphat dienen, hatte ich keinen Erfolg, da die dünnen Darmschnitte durch die Behandlung mit den vorgeschriebenen Reagentien trotz aller Vorsicht stets mehr oder weniger zerstört und von den Objektträgern abgelöst wurden. Es konnte deshalb nicht abgeklärt werden, ob in den Kalkkörperchen im Mitteldarmepithel der Honigbiene neben Kalziumkarbonat auch phosphorsaurer Kalk vorhanden ist.

Als eine der besten und empfindlichsten mikrochemischen Kalziumreaktionen bezeichnet LISON (1936) die *Methode von Crétin* mit Gallussäure-Formel (CRÉTIN, 1923, 1924 ; ROMEIS, 1948).

Man benötigt dazu ein Reagens aus 2 Teilen Gallussäure und 1 Teil Trioxymethylen. Von diesem in einem Mörser fein zerriebenen Ge-

---

Abb. 5. — Kalziumnachweis im Mitteldarmepithel einer adulten Arbeitsbiene : Methode v. KOSSA (Kalk schwarz).

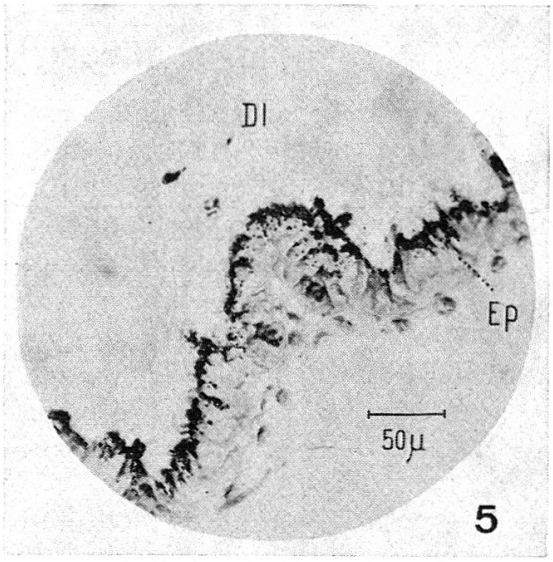
Abb. 6. — Kalziumnachweis im Mitteldarmepithel einer jungen Bienenkönigin : Methode v. KOSSA (Kalk schwarz).

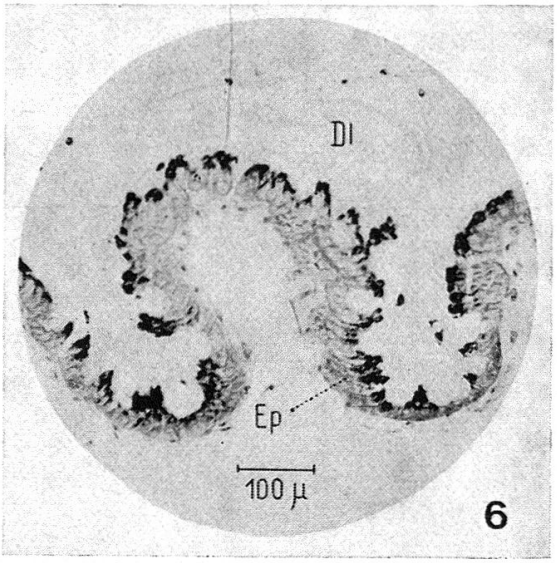
Abb. 7. — Kalziumnachweis im Mitteldarmepithel einer Arbeitsbiene : Methode STÖLZNER (Kalk schwarz).

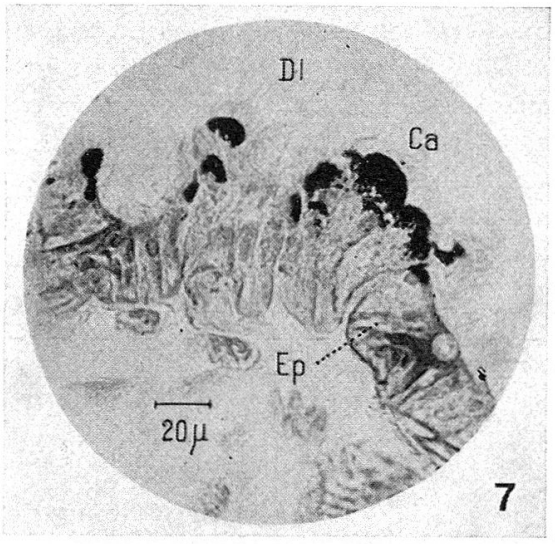
Abb. 8. — Kalziumnachweis im Mitteldarmepithel einer adulten Arbeitsbiene mit Purpurin nach GRANDIS und MAININI.

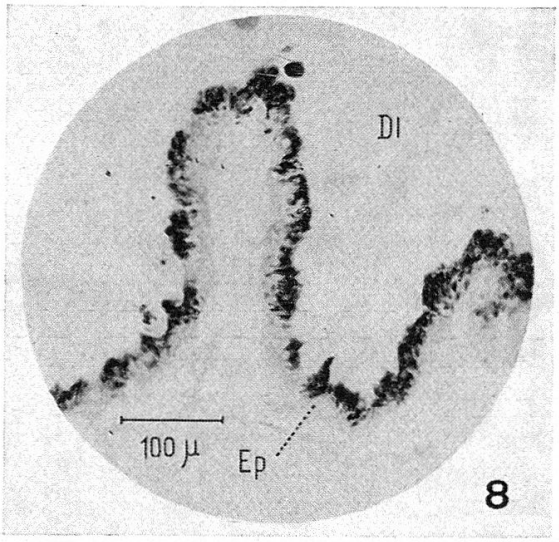
Abb. 9. — Kalkkörperchen im Mitteldarmepithel einer Arbeitsbiene : Galleinfärbung.

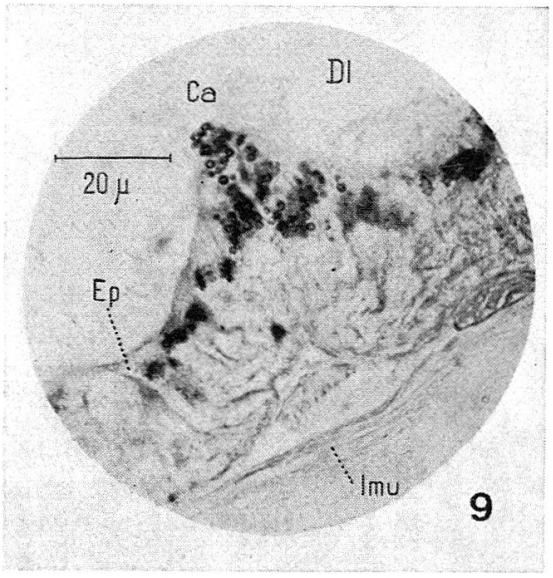
Abb. 10. — Kalkkörperchen im Mitteldarmepithel einer Bienenkönigin : Färbung mit WEIGERT's Eisenhämatoxylin.

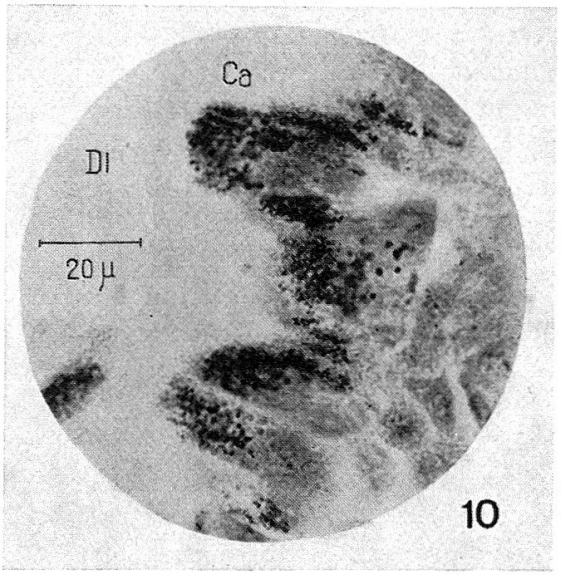

Dl
Ep
50µ
5


Dl
Ep
100 µ
6


Dl
Ca
Ep
20µ
7


Dl
100 µ
Ep
8


Ca
Dl
20 µ
Ep
Imu
9


Ca
Dl
20 µ
10

misch werden unmittelbar vor Gebrauch 0,25 g mit 5 ccm heissem destilliertem Wasser übergossen. Dann setzt man tropfenweise 0,5 ccm Ammoniak von 18° BÉ zu und wartet ab, bis die anfänglich rote Lösung strohgelb und damit verwendungsbereit geworden ist. Das noch lauwarme Reagens wird auf die entparaffinierten und mit Chloroform gewaschenen Schnitte in genügender Menge aufgetropft und nach 10–15 Sekunden wieder vorsichtig abgesaugt oder einfach weggeschleudert ; sie bleiben dann an der Luft so lange liegen, bis sich der Kalk im Gewebe deutlich indigoblau gefärbt hat. Die blaue Lackfärbung ist für Kalzium spezifisch. Nach kurzem Übertragen der Schnitte in eine gesättigte wässerige Lösung von Kalziumsulfat und nachfolgendem Auswaschen in destilliertem Wasser können die Präparate mit Eosin nachgefärbt und in üblicher Weise über Alkohol und Xylol in Balsam eingeschlossen werden.

Die Kalkkörperchen in den Mitteldarmepithelzellen der adulten Bienen reagieren beim Verfahren von CRÉTIN deutlich positiv. Die Färbung ist aber, mindestens in meinen Präparaten, weniger prägnant als die mit WEIGERT'SCHEM Eisenhämatoxylin oder Gallein. Zudem ist die Methode recht diffizil und man muss auch hier mit Misserfolgen rechnen, weil die Schnitte durch das stark alkalische Reagens häufig lädiert oder von den Objektträgern abgelöst werden.

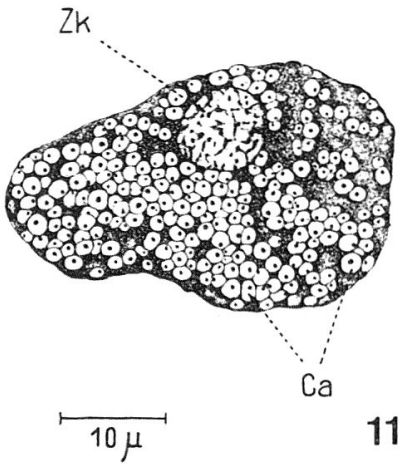
Fasst man die in diesem Abschnitt mitgeteilten Ergebnisse zusammen, so ergibt sich folgendes : von 10 verschiedenen, in der Fachliteratur empfohlenen und von mir angewandten Kalziumreaktionen sprechen alle dafür, dass es sich bei den stark lichtbrechenden Zelleinschlüssen im Mitteldarmepithel der adulten Honigbiene tatsächlich um Kalkkörperchen handelt, wie KOEHLER (1921) bereits früher mit teils andern Methoden festgestellt hat. Damit soll aber keineswegs gesagt sein, dass diese intrazellulären Gebilde nur aus reinem Kalziumkarbonat bestehen ; es ist sehr wohl möglich, dass an ihrem Aufbau, wenn auch in geringerer Menge, noch andere Stoffe beteiligt sind. Darüber könnten möglicherweise spektralanalytische und neuere Prüfungsverfahren Aufschluss geben.

Über den « Innenkörper » der lichtbrechenden Zelleinschlüsse in den Mitteldarmepithelzellen der Honigbiene

Von besonderem Interesse ist natürlich die Frage nach der Natur des von HERTIG (1923) entdeckten « Innenkörpers » in den lichtbrechenden, aus Kalziumkarbonat bestehenden Zelleinschlüssen im Mitteldarmepithel der Honigbiene. Da wäre zunächst zu erwähnen, dass man dieses sehr kleine, seltsame Gebilde nach meinen Erfahrungen nicht nur mit der GIEMSA-, sondern ebensogut mit der WEIGERT'SCHEN Eisenhämatoxylin- oder der Azanfärbung deutlich sichtbar machen kann. So findet man beispielsweise in sorgfältig hergestellten Ausstrichen des Mitteldarmgewebes, welche in absolutem Äthylalkohol

fixiert und nach der WEIGERT'SCHEN Methode gefärbt werden, viele Epithelzellen, deren Kalkkörperchen fast alle den punktförmigen, zentral oder etwas exzentrisch liegenden « Innenkörper » in tiefblauschwarzem Ton äusserst gut erkennen lassen (Abb. 11). Das ist vor allem dann der Fall, wenn man die Präparate mit verdünntem salzsaurem Alkohol vorsichtig differenziert, bis die Kalkkörperchen weitgehend entfärbt sind.

Sehr schön ist das zentrale Gebilde in den Kalkkörperchen auch im Ventriculusepithel von ältern Arbeiterinnen- und Drohnenpuppen zu sehen, wenn die Därme in VAN LEEUWEN'S Gemisch [1] oder in CARNOY fixiert und die Schnittpräparate mit Azokarmin-Anilinblau-Orange nach HEIDENHAIN-MALLORY (ROMEIS, 1948) gefärbt werden. Die in diesem Entwicklungsstadium bereits zahlreich vorhandenen, grösstenteils über den Zellkernen liegenden, farblosen Kalkkörperchen (Abb. 12) heben



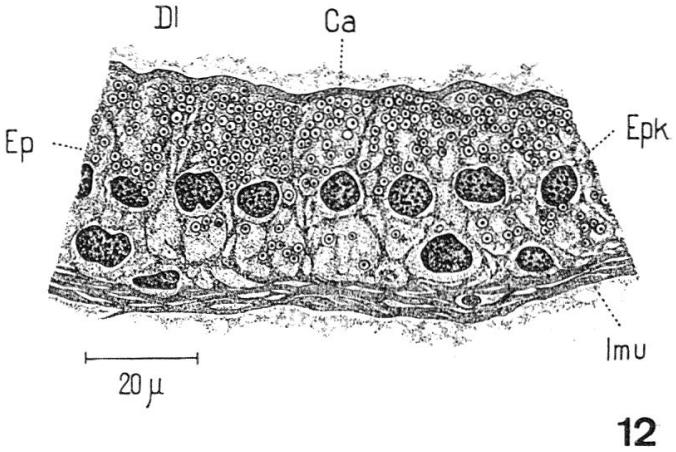


Abb. 11. — Mitteldarmepithelzelle einer Bienenkönigin mit Kalkkörperchen (Ausstrich gefärbt mit WEIGERT's Eisenhämatoxylin).

Abb. 12. — Längsschnitt durch den Mitteldarm einer Drohnenpuppe (Azokarmin-Färbung nach HEIDENHAIN-MALLORY)

sich vom blassrötlichen Zytoplasma der Epithelzellen sehr deutlich ab und besitzen alle im Zentrum einen « Innenkörper », welcher entweder intensiv blau oder rot tingiert ist ; das letztere trifft nach meinen Beobachtungen hauptsächlich für die wenigen, der Zellbasis benachbarten Kalkkörperchen zu. Dieses färberische Verhalten des « Innenkörpers » sagt natürlich über seinen stofflichen Aufbau so gut wie gar nichts aus. In diesem Zusammenhang ist es nun aber sehr bemerkenswert, dass man bei der Honigbiene ganz analoge Gebilde auch in allen Urat-

[1] Zusammensetzung: 1% Pikrinsäure in absol. Alkohol 12 Teile, 40%iges Formalin 2 Teile, Chloroform 2 Teile, Eisessig 1 Teil.

konkrementen der pupalen Exkretzellen feststellen kann (Abb. 13 A und B); sie färben sich mit WEIGERT's Eisenhämatoxylin ebenfalls blauschwarz und mit Azokarmin G leuchtend rotviolett. Es handelt sich dabei jedenfalls nicht, wie SCHNELLE (1924/25) annimmt, um sehr kleine, punktförmige Harnkonkremente, denn sie sind im Gegensatz zu den typischen Uratablagerungen in den Exkretzellen der Bienenpuppen in Wasser unlöslich. Ich vermute, dass wir es hier wie auch beim « Innenkörper » der lichtbrechenden Zelleinschlüsse des Mitteldarmepithels möglicherweise eher mit Mitochondrien zu tun haben, welche gewissermassen den Kristallisationskern der Urat-, bezw. der Kalkkonkretionen bilden. Ob diese Annahme zulässig und richtig ist, müsste allerdings erst noch durch weitere, spezielle Untersuchungen abgeklärt werden.

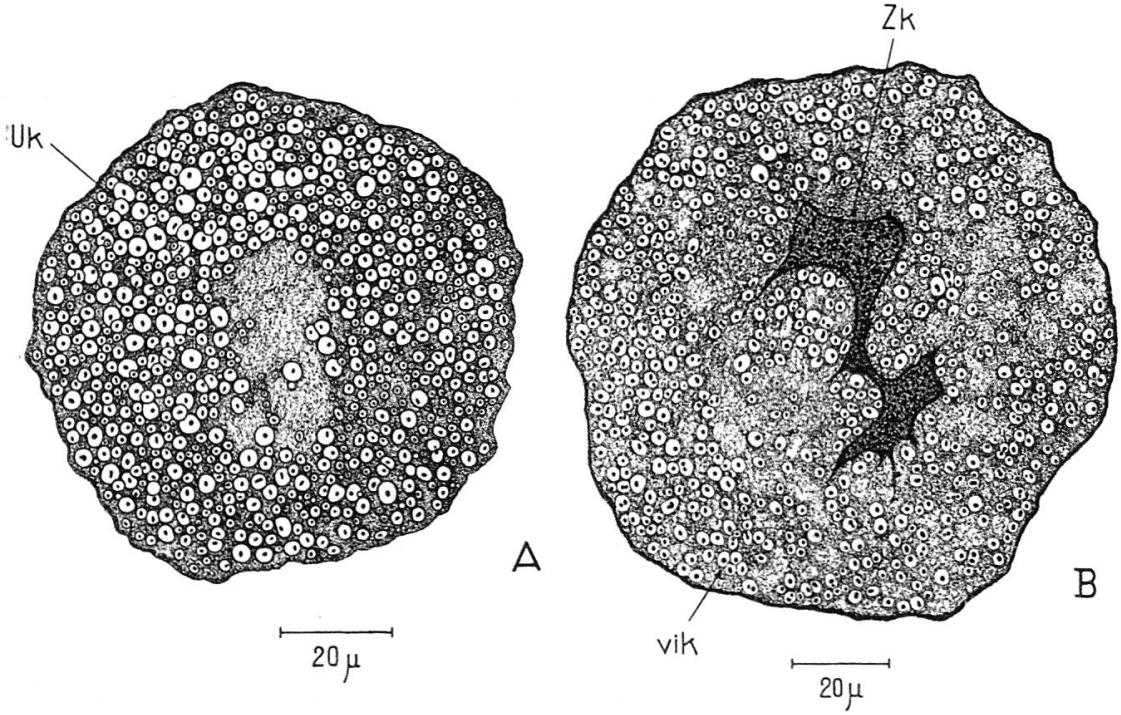


Abb. 13. Exkretzelle aus dem Fettkörper einer Drohnenpuppe. — A: Färbung mit alkoholischer Anilinblau-Eosinlösung — B: Urate eliminiert. Färbung mit Azokarmin nach HEIDENHAIN-MALLORY.

Das Auftreten der Kalkkörperchen in den Mitteldarmepithelzellen im Verlauf der postembryonalen Entwicklung

Die Ausführungen von KOEHLER (1921) über das postembryonale Auftreten der Kalkkörperchen beschränken sich auf den Hinweis, dass sie bei den Arbeiterinnen- und Drohnenlarven im Mitteldarmepithel noch keine und bei den Puppen, sowie bei schlüpfenden Bienen im Vergleich zum adulten Insekt nur bedeutend weniger und kleinere kalkhaltige Einschlüsse feststellen konnte. Das veranlasste mich, sämt-

liche Entwicklungsstadien der Arbeitsbiene vom Ei bis zur Imago in dieser Hinsicht planmässig zu untersuchen, wobei ich für den Kalziumnachweis in den Schnittpräparaten neben der Alizarin- und Eisenhämatoxylinfärbung vorwiegend die früher beschriebene Methode von KOSSA benützte. Dabei zeigte sich, dass der Kalk im Ventriculusepithel der Arbeiterinnenlarven mit den von mir angewandten Prüfungsverfahren frühestens unmittelbar nach dem Futterwechsel, also erst dann nachgewiesen werden kann, wenn die etwa 3½–4 Tage alten Maden statt reinen Futtersaft mit der Nahrung Pollen aufgenommen haben. Sofern das Kalzium vordem nicht in gelöster oder maskierter Form vorliegt, scheinen die Darmepithelien bis zu diesem Zeitpunkt kalkfrei zu sein.

Die ersten Kalkkörperchen finden sich im vordersten Abschnitt des Mitteldarmes und zwar stets dicht über den Kernen in den Kuppen der Epithelzellen. Mit fortschreitendem Alter der Larven nehmen die Kalkablagerungen im Mitteldarmepithel sichtlich rasch zu (Abb. 14) und treten dann nicht nur im vordern, sondern auch im mittleren und hintern Teil des Ventriculus auf. Bei den reifen, 5–5½ Tage alten Rundmaden wird in der Regel offenbar ein Maximum erreicht, wobei die Zahl und Grösse der Kalkkörperchen in den einzelnen Zellen allerdings von vorn nach hinten merklich abnimmt. Zudem ist zu bemerken, dass nach meinen Beobachtungen die Menge des Kalkes von Larve zu Larve deutliche Unterschiede zeigt, was möglicherweise auf eine quantitativ und qualitativ ungleiche Ernährung zurückzuführen ist.

Wenn die reife Arbeiterinnenmade zwischen dem 5. und 6. Tag der Larvenperiode die Nahrungsaufnahme einstellt und ihre Wabenzelle von den Stockbienen verdeckelt wird, entleert sie den Darm und fertigt mit dem Sekret ihrer Spinnendrüsen den Kokon an. Gleichzeitig beginnt in dem nun folgenden, drei Tage dauernden Streckmadenstadium nach den Untersuchungen von LOTMAR (1945) und DOBROVSKY (1951) die Metamorphose des Darmtraktes. Dabei löst sich das larvale Mitteldarmepithel auf und wird mitsamt den Kalkkörperchen in das Darmlumen abgestossen (Abb. 15), um mit den Exkrementen ausgeschieden zu werden. Auf diese Weise scheint der in der Larvenperiode im Ventriculusepithel abgelagerte Kalk aus dem Larvenkörper zu verschwinden, denn das neugebildete Puppenepithel des nun englumigen Mitteldarmes erweist sich bei allen Streckmaden zunächst als völlig kalkfrei (Abb. 16) ; das gleiche gilt auch für den sehr gut entwickelten Fettkörper. Aber schon kurz danach, wenn sich die Streckmade nach der letzten Larvenhäutung in die Puppe verwandelt, finden wir im Mitteldarmepithel wiederum Kalkkörperchen und zwar vorerst nur in der Verschlussplatte, welche sich mittlerweilen zwischen dem Stomodaeum und dem Mesenteron gebildet hat (Abb. 17). Während der Puppenzeit treten dann die Kalkgebilde, von vorn nach hinten fortschreitend, in allen Mitteldarmepithelzellen auf (Abb. 18), wobei freilich auch hier von Puppe zu Puppe merkliche graduelle Unterschiede

festzustellen sind. Das Ventriculusepithel der schlüpfenden Imago (Abb. 19) ähnelt in bezug auf die Kalkablagerungen schon weitgehend dem der adulten Arbeitsbiene (Abb. 5). Immerhin mag die Zahl und Grösse der Kalkkörperchen in den einzelnen Epithelzellen bei der schlüpfreifen Biene im allgemeinen noch etwas geringer sein.

Das soeben beschriebene Auftreten der Kalkkörperchen im Mitteldarmepithel der postembryonalen Entwicklungsstadien gibt unwillkürlich Anlass zu einigen Überlegungen. Die Feststellung, dass der Kalk bei den Arbeiterinnenlarven erst nach der Aufnahme des pollenreichen Mischfutters als Granula im Ventriculusepithel erscheint, könnte leicht den Eindruck erwecken, dass die Entstehung der Kalkkörperchen mit dieser Ernährung unmittelbar in Beziehung stehe. Gewiss darf man annehmen, dass das Kalzium aus dem Blütenstaub stammt. Wenn wir aber bedenken, dass die Bienenkönigin in ihrem larvalen, pupalen und imaginalen Mitteldarmepithel ebenfalls sehr viele kalkhaltige Zelleinschlüsse aufweist, obgleich sie sowohl im Larven- als auch im adulten Stadium ausschliesslich mit reinem Futtersaft und nie direkt mit Pollen ernährt wird, müssen wir vermuten, dass nicht nur das Mischfutter, sondern auch die von den Ammenbienen erzeugten qualitätsverschiedenen Futtersäfte (v. RHEIN, 1933, 1956 ; HOFFMANN, 1960) eine gewisse Menge Kalk enthalten. Der Kalziumgehalt des Arbeiterinnenfuttersaftes könnte jedoch vielleicht so gering sein, dass er in den ersten drei Larventagen noch nicht zur Bildung von Kalkkörperchen ausreicht. Ob die für die Aufzucht der Königinnen-, Arbeiterinnen- und Drohnenlarven dienenden Futtersäfte in dieser Hinsicht schon untersucht und verglichen wurden, ist mir nicht bekannt. Ganz abgesehen davon müssen wir aber auch an die Möglichkeit denken, dass der Kalk in den Mitteldarmepithelzellen der jüngsten

---

Abb. 14. — Längsschnitt durch den vordern Teil des Mitteldarmes einer älteren Arbeiterinnenlarve. Kossa-Reaktion (Kalk schwarz).

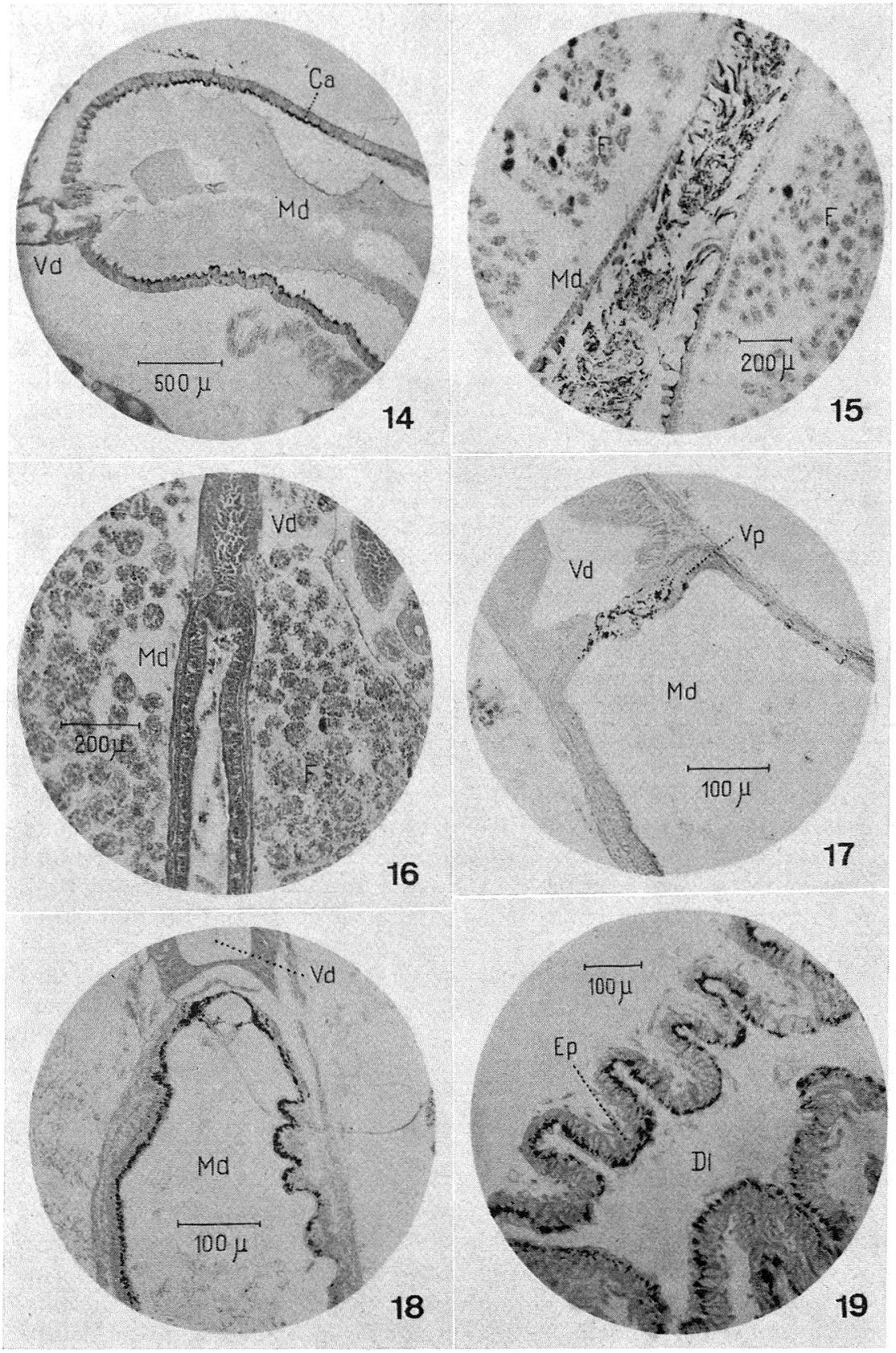
Abb. 15. — Längsschnitt durch den Mitteldarm einer Arbeiterinnenlarve beim Beginn der Metamorphose : Auflösung und Abstossung des larvalen Epithels. Kossa-Reaktion (Kalk schwarz).

Abb. 16. — Längsschnitt durch den Vorder- und Mitteldarm einer jungen Arbeiterinnen-Streckmade. Kossa-Reaktion. Mitteldarmepithel kalkfrei.

Abb. 17. — Längsschnitt durch den Vorder- und Mitteldarm einer in Verwandlung begriffenen Arbeiterinnen-Streckmade. Kossa-Reaktion. Kalk in der Verschlussplatte zwischen Vorder- und Mitteldarm schwarz.

Abb. 18. — Längsschnitt durch den vordern Teil des Mitteldarmes einer Arbeiterinnenpuppe. Kossa-Reaktion (Kalk schwarz).

Abb. 19. — Längsschnitt durch den Mitteldarm einer schlüpfenden Arbeitsbiene. Kossa-Reaktion (Kalk schwarz).


Ca
Md
Vd
500 µ
14
F
F
Md
200 µ
15
Vd
Md
200 µ
F
16
Vp
Vd
Md
100 µ
17
Vd
Md
100 µ
18
100 µ
Ep
Dl
19

Bienenmaden allfällig in gelöstem oder maskiertem Zustand vorliegen könnte und sich aus diesem Grunde mit den von mir benützten Methoden nicht nachweisen lässt.

Ein besonderes Interesse verdient sodann das vorübergehende Verschwinden der Kalkkörperchen aus dem Mitteldarmepithel während der Metamorphose und ihr allmähliches Wiedererscheinen nach der Verwandlung. Da die Streckmaden und Puppen kein Futter mehr aufnehmen, können sie auf diese Weise den Kalk, welcher bei der Auflösung des larvalen Ventriculusepithels (Abb. 15) abgestossen und beim Defäzieren anscheinend mit den Exkrementen ausgeschieden wird, jedenfalls nicht ersetzen. Man muss sich deshalb fragen, ob der Kalk bei der Entleerung des Darmtraktes vielleicht gar nicht aus dem Organismus eliminiert, sondern mindestens zum Teil vom Enddarm resorbiert und für kurze Zeit in irgendwelchen andern Geweben, beispielsweise im Fettkörper oder aber in der Hämolymphe zur Weiterverwendung gespeichert wird. Sollte das der Fall sein, so würde der postembryonale Kalkstoffwechsel weitgehend mit dem von LOTMAR (1938) untersuchten Eisenstoffwechsel in der sich entwickelnden Biene übereinstimmen. Auch das Eisen, welches sich mit der Berlinerblaureaktion oder nach der Methode von TIRMANN & SCHMELZER (ROMEIS, 1948) leicht nachweisen lässt, erscheint im larvalen Darmepithel erst nach der Pollenaufnahme und verschwindet im Streckmadenstadium aus diesem Gewebe ebenfalls gänzlich, um vom 4. oder 5. Puppentag hinweg in der Grenzlamelle zwischen den Epithelzellen und der Muskulatur des Darmes wiederum reichlich aufzutreten. Immerhin bestehen doch zwei Unterschiede ; einmal findet sich das Eisen in der Zwischenzeit, d. h. während und kurz nach der Metamorphose im Fettkörper und ausserdem sind die Darmepithelien der geschlüpften Biene grösstenteils eisenfrei. Im Gegensatz dazu konnte ich in den Fettkörperzellen und übrigens auch in der Hämolymphe von Arbeiterinnenstreckmaden und Puppen mit den von mir angewandten Prüfungsverfahren keinen Kalk nachweisen, was allerdings wenig besagt, da er sowohl im Fettkörper als auch im Blut in gelöstem oder maskiertem Zustand vorhanden sein könnte. Vielleicht würde in diesem Fall der Nachweis mit andern und vor allem mit empfindlicheren Methoden gelingen. Einige wenige Trophozyten mit grössern, braunschwarzen Konkrementen, welche ich in KOSSA-Schnittpräparaten bei einer jungen Streckmade und einer älteren Puppe feststellte, erwiesen sich bei genauer Untersuchung nicht als Fett-, sondern als Exkretzellen. Man darf nicht vergessen, dass auch die Harnsäure und gewisse Urate eine Silbernitratlösung zu reduzieren vermögen (KRAUSE, 1927 ; ROMEIS, 1948).

In diesem Zusammenhang ist jedoch erwähnenswert, dass bei mehreren Streckmaden und Puppen mit Hilfe der KOSSA-Methode und mit verschiedenen indikatorischen Farbstoffen (Purpurin, Alizarin, Gallein und Eisenhämatoxylin) in den Epithelzellen der sich entwickelnden imaginalen Harngefässe Kalziumablagerungen in Form von kleinen

Granula festgestellt werden konnten. Ob es sich dabei wie in den MALPIGHI'SCHEN Gefässen der adulten Bienenköniginnen und Arbeitsbienen (Abb. 20 und 21) wirklich um Kalk oder um eine andere Kalziumverbindung handelt (FYG, 1932), ist freilich nicht bekannt. Immerhin spricht dieser Befund in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von LOTMAR (1945) dafür, dass die imaginalen Harngefässe offenbar bereits im Puppenstadium exkretorisch tätig sind.

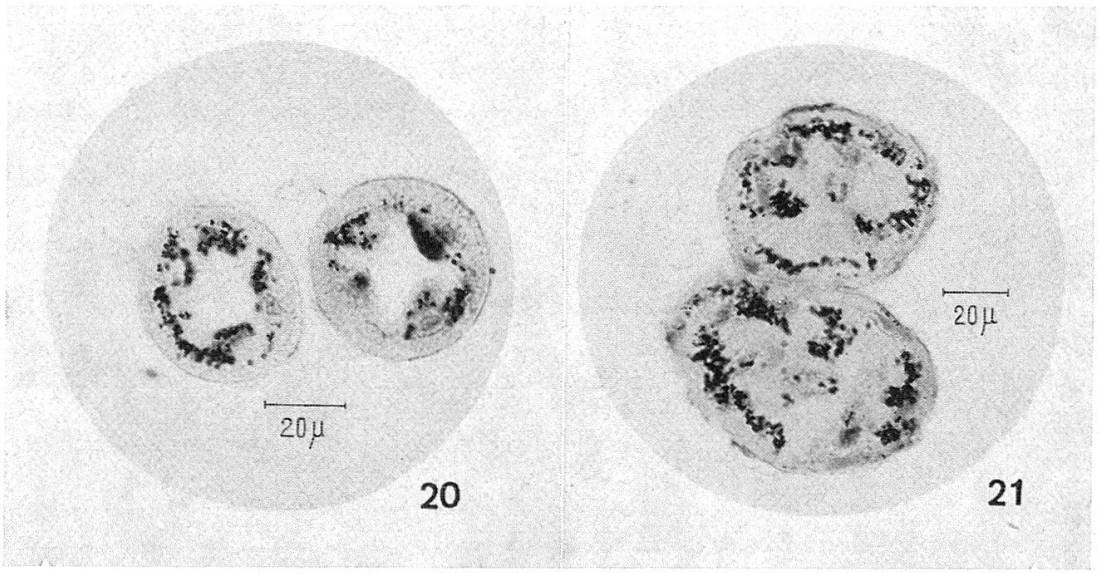


Abb. 20. — Kalziumnachweis in den Harngefässen einer adulten Arbeitsbiene: Methode v. KOSSA (Kalk schwarz).

Abb. 21. — Kalkfärbung mit WEIGERT's Eisenhämatoxylin in den Harngefässen einer Bienenkönigin.

Leider geben uns die hier mitgeteilten Untersuchungsergebnisse keinen Aufschluss über die physiologische Bedeutung der Kalkkörperchen im Mitteldarmepithel der Honigbiene. Ich zweifle aber daran, dass es sich dabei lediglich um belanglose, mit der Nahrung aufgenommene und unverwertbare Ballaststoffe handelt. Vermutlich dürften sie im Stoffwechsel der Entwicklungsstadien und der Imagines doch irgendeine, noch zu erforschende Rolle spielen.

Zusammenfassung

Die vorliegende Abhandlung beschäftigt sich mit den stark lichtbrechenden Zelleinschlüssen im Mitteldarmepithel der adulten Honigbiene, welche nach den Untersuchungen von KOEHLER (1921) vorwiegend aus Kalziumkarbonat bestehen. Mit zehn verschiedenen, in der Fachliteratur zum Kalziumnachweis empfohlenen Methoden konnten

die KOEHLER'SCHEN Befunde bestätigt werden. Bei dem von HERTIG (1923) entdeckten Körperchen im Innern der kalkhaltigen Zelleinschlüsse dürfte es sich möglicherweise um Mitochondrien handeln, die gleichsam den Kristallisationskern der Kalkkörperchen bilden. Im weitern wird das Auftreten dieser mikroskopisch kleinen Kalkgebilde im Verlaufe der Postembryogenese beschrieben. Die physiologische Bedeutung der Kalkkörperchen ist noch unbekannt.

LITERATUR

ABDERHALDEN, E., 1912. *Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden.* **5** (2): 1099–1147, Berlin-Wien.

CRÉTIN, A., 1923. *De quelques méthodes de recherche du phosphore et de la chaux dans les tissus.* Thèse de médecine, Paris.

— 1924. *Sur un nouveau réactif du calcium applicable aux recherches histologiques.* Bull. Histol. appl., **1** (3): 125.

DOBROVSKY, T. M., 1951. *Postembryonic changes in the digestive tract of the worker bee (Apis mellifica L.).* Cornell Univ. Agr. Exp. Sta., Mem. 301.

FRENZEL, J., 1886. *Einiges über den Mitteldarm der Insekten, sowie über Epithelregeneration.* Arch. mikr. Anat., **26**: 229–306.

FYG, W., 1932. *Untersuchungen über die Kalkkörperchen im Bienendarm.* Schweiz. Bienenztg., **55** (4): 189–194.

GOMORI, G., 1934. *Der mikrotechnische Nachweis unlöslicher Kalksalze in den Geweben.* Virchow's Arch. path. Anat., **286**: 682–689.

GRANDIS & MAININI, 1900. *Sur une réaction colorée qui permet de révéler les sels de calcium déposés dans les tissus organiques.* Arch. ital. Biol., **34**: 73–78.

HERTIG, M., 1923. *The normal and pathological histology of the ventriculus of the honey bee, with special reference to infection with Nosema apis.* Journ. Parasitology, **9**: 109–140.

HINTZSCHE, E., 1943. *Die Entwicklung der histologischen Färbetechnik.* Ciba-Zeitschr., **8** (88): 3074–3106.

HOFFMANN, J., 1960. *Untersuchungen über die Herkunft von Komponenten des Königinnenfuttersaftes der Honigbienen.* Z. Bienenforsch., **5** (4): 101–111.

KOEHLER, A., 1920. *Untersuchungen über die Natur der den Zellen des Bienenmitteldarmes eigentümlichen Körperchen.* Schweiz. Bienenztg., **43** (10): 364–368.

— 1921. *Über die Einschlüsse der Epithelzellen des Bienendarmes und die damit in Beziehung stehenden Probleme der Verdauung.* Z. angew. Entomol., **7**: 68–91.

v. KOSSA, 1901. *Über die im Organismus künstlich erzeugten Verkalkungen.* Ziegler's Beitr. allg. Path. & path. Anat., **29**: 163.

KRAUSE, R., 1927. *Enzyklopädie der mikroskopischen Technik.* 3. Aufl., Verlag Urban & Schwarzenberg, Berlin, **3**: 2249–2261.

LANGERON, M., 1934. *Précis de Microscopie.* 5e édit., Masson & Cie, Paris.

LISON, L., 1936. *Histochimie animale.* Ed. Gauthier-Villars, Paris.

LOELE, K., 1913. *Beiträge zur Kenntnis der Histologie und Funktion des Hymneopterendarmes.* Z. allg. Physiol., **16**: 1–36.

LOTMAR, R., 1938. *Untersuchungen über den Eisenstoffwechsel der Insekten, besonders der Honigbiene.* Rev. Suisse Zool., **45**: 237–271.

— 1945. *Die Metamorphose des Bienendarmes.* Beihefte Schweiz. Bienenztg., **1** (10): 443–506.

MACALLUM, A. B., 1912. *Die Methoden der biologischen Mikroanalyse.* In : Abderhalden's Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, **5** (2) : 1099–1147.

PETERSEN, H., 1912. *Beiträge zur vergleichenden Physiologie der Verdauung. V. Die Verdauung der Honigbiene.* Pflüger's Arch. ges. Physiol., **145** : 121–151.

v. RHEIN, W., 1933. *Über die Entstehung des weiblichen Dimorphismus im Bienenstaate.* Arch. Entw. mech., **129** : 601–665.

— 1956. *Über die Ernährung der Arbeitermade von Apis mellifica L., insbesondere in der Altersperiode.* Insectes sociaux, **3** (1) : 203–212.

ROEHL, W., 1905. *Über Kalkablagerung und -ausscheidung in der Niere.* Ziegler's Beitr. allg. Path. & path. Anat., 7, Suppl. : 456–467.

ROMEIS, B., 1948. *Mikroskopische Technik.* 15. Aufl., Leibnitz Verlag, München.

SCHIEMENZ. P., 1883. *Über das Herkommen des Futtersaftes und der Speicheldrüsen der Bienen.* Z. wiss. Zool., **38** : 71–135.

SCHMORL, G., 1925. *Die pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden.* 14. Aufl., Verlag F. C. W. Vogel, Leipzig.

SCHNELLE, H., 1924/25. *Der feinere Bau des Fettkörpers der Honigbiene.* Arch. Bienenkunde, **6** : 83–117.

STÖLTZNER, W., 1905. *Über Metallfärbung verkalkter Gewebe.* Virchow's Arch. path. Anat., **180**.

SCHULTZ-BRAUNS, O., 1931. *Die Methode der Schnittveraschung unfixierter tierischer Gewebe.* Z. wiss. Mikr., **48** : 161–191.

TRAPPMANN, W., 1923. *Die Bildung der peritrophischen Membran bei Apis mellifica L.* Arch. Bienenkunde, **5** : 204–212.

WEIL, E., 1935. *Vergleichend-morphologische Untersuchungen am Darmkanal einiger Apiden und Vespiden.* Z. Morph. Ökol. Tiere, **30** : 438–478.

ABKÜRZUNGEN

Be	Krypten
b. M	Basalmembran
Ca	Kalkkörperchen
Dl	Darmlumen
Ep	Mitteldarmepithel
Epz	Epithelzellen
Epk, Epz. K	Epithelzellkerne
F	Fettkörperzellen
ä. Lm	äussere Längsmuskelfasern
i. Lm	innere Längsmuskelfasern
lmu	Längsmuskulatur des Mitteldarmes
Md	Mitteldarm
Rm	Ringmuskulatur des Mitteldarmes
Rz	Regenerationszellen
Uk	Uratkonkremente
Vd	Vorderdarm
vik	Vakuolen im Zytoplasma mit « Innenkörper »
Vp	Verschlussplatte zwischen Vorder- und Mitteldarm
Zk	Zellkern